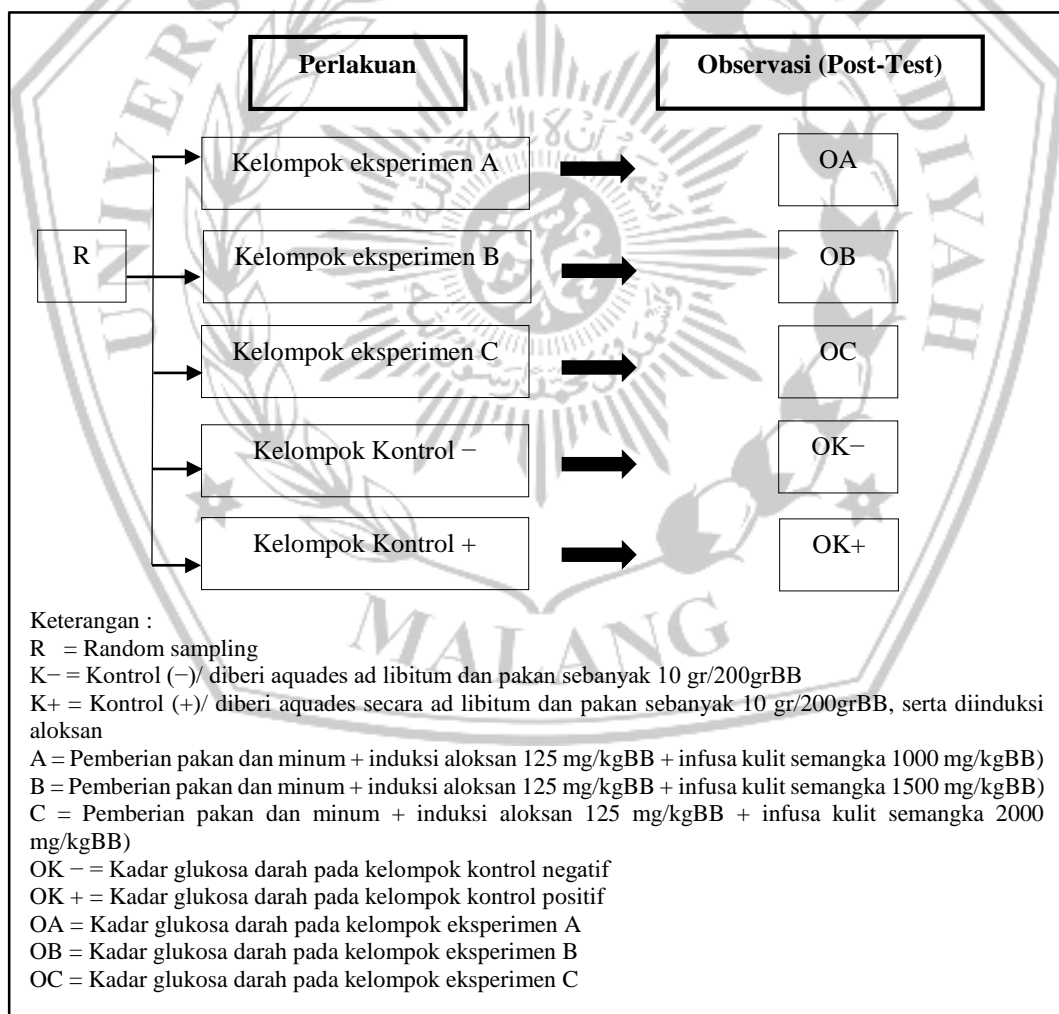


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan Pendekatan Penelitian

Pendekatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pendekatan kuantitatif. Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen sesungguhnya (*true-experimental research*). *True experimental research* adalah penelitian yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh antara satu variabel dengan variabel lainnya (Siyoto & Sodik, 2015). Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *The Post Test Only with Control Group Design*. Penelitian hanya dilakukan pada *post test*, dengan membandingkan hasil observasi pada kelompok eksperimen dan kontrol. Secara rinci desain penelitian ini dapat digambarkan di gambar 3.1.



Gambar 3.1. Skema Desain *Post-Test Only with Control Group Design*

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang, Jalan Tlogomas Nomor 246 A dan Laboratorium Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang Kampus II. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung selama ± 5 bulan yaitu pada bulan Desember 2019 - April 2020.

3.3. Populasi, Sampel, dan Teknik Sampling

3.3.1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah keseluruhan tikus putih jantan galur wistar dengan karakteristik usia 4-5 bulan, berat badan 150-200 gram.

3.3.2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan galur wistar, dengan karakteristik yang telah ditentukan, dipilih secara acak, serta dibuat dalam kondisi hiperglikemia.

3.3.3. Sampel Size

Jumlah unit percobaan yang digunakan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus Federer (Prihanti, 2018), sebagai berikut :

Untuk menghitung jumlah replikasi (ulangan) : $(t - 1) (r - 1) \geq 15$

Untuk menghitung jumlah unit percobaan : $n = t \times r$

Keterangan :

$t = treatment$ (perlakuan)

$r = replikasi$ (pengulangan)

$$n = t \times r$$

$$n = 5 \times r$$

$$n = 5 \times [(t - 1) (r - 1) \geq 15]$$

$$n = 5 \times [(5 - 1) (r - 1) \geq 15]$$

$$n = 5 \times [4 (r - 1) \geq 15]$$

$$n = 5 \times [4r - 4 \geq 15] \longrightarrow \begin{array}{l} 4r \geq 15 + 4 \\ r \geq 19/4 \\ r \geq 4,75 \\ \text{(pembulatan menjadi 5} \\ \text{pengulangan)} \end{array}$$

$n = 5 \times 5$
 $n = 25 \text{ sampel}$

Dengan demikian, jumlah sampel yang dibutuhkan adalah 25 sampel.

3.3.4. Teknik Sampling

Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah *simple random sampling* dimana teknik pengambilan sampel tikus (hewan coba) ini dilakukan dengan cara acak dalam populasi yang homogen, sehingga setiap satuan sampling yang ada dalam populasi mempunyai peluang yang sama untuk dipilih ke dalam sampel.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah :

1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah berbagai dosis infusa albedo kulit semangka (*Citrullus lanatus*)

2. Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar glukosa darah tikus jantan (*Rattus norvegicus*) hiperglikemia

3. Variabel kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah pemberian pakan jenis BR1 dan minuman tikus berupa aquades, pembersihan dan perawatan kandang serta penggantian alas serutan kayu dilakukan 2 hari sekali.

3.5. Definisi Operasional Variabel

1. Dosis sediaan infusa albedo kulit semangka adalah berbagai dosis sediaan infusa yang dibuat dengan cara menyeduh sampel segar albedo kulit semangka, yaitu lapisan tengah (mesokarp) berupa daging tebal yang berwarna putih pada kulit semangka dengan menggunakan pelarut aquades atau air sebanyak 200 ml selama 15 menit dengan suhu 90⁰C. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini

adalah 1000 mg/kgBB/hari infusa kulit semangka; 1500 mg/kgBB/hari infusa kulit semangka; 2000 mg/kgBB/hari infusa kulit semangka. Pemberian dosis sediaan infusa ke hewan coba dilakukan 1 kali dalam sehari pada pukul 09.00 WIB.

2. Kadar glukosa darah adalah kadar glukosa dalam darah tikus yang diukur setelah pemberian perlakuan penelitian (pemberian pakan, induksi aloksan, serta pemberian infusa kulit semangka). Darah tikus diambil dari bagian jantung hewan coba sebanyak 2-3 ml dan diukur kadar glukosa darahnya menggunakan metode spektrofotometri.
3. Hiperglikemia adalah kondisi dimana kadar glukosa dalam darah (hal ini adalah hewan coba tikus jantan) melebihi normal. Kadar glukosa darah tikus yang telah mengalami diabetes melitus adalah > 198 mg/gl (Harijanto & Dewajanti, 2017).
4. Tikus jantan adalah hewan coba yang digunakan dalam penelitian, dengan kriteria usia 4-5 bulan, berat badan 150-200 gram, tikus yang digunakan adalah tikus jantan galur wistar.
5. Jenis pakan yang digunakan untuk pemeliharaan hewan coba adalah BR1, yaitu jenis pakan ternak ayam yang diberikan sebanyak 10 gr/200grBB, serta pemberian minum dengan aquades secara ad libitum. Pakan diberikan sehari sekali pada pukul 10.00 WIB.
6. Pembersihan dan perawatan kandang dilakukan dua hari sekali dengan membersihkan kandang dari debu dan kotoran hewan uji untuk menjaga kebersihan hewan penelitian, serta mengganti serutan kayu lama dengan yang baru sebagai alas kandang tikus.

3.6.Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan (satu perlakuan kontrol dan empat perlakuan dosis) dengan 5 kali ulangan.

K- = Kontrol (-)/ diberi aquades ad libitum dan pakan sebanyak 10 gr/200grBB

K+ = Kontrol (+)/ diberi aquades secara ad libitum dan pakan sebanyak 10 gr/200grBB, serta diinduksi aloksan

A = Pemberian pakan dan minum + induksi aloksan 125 mg/kgBB + infusa kulit semangka 1000 mg/kgBB)

B = Pemberian pakan dan minum + induksi aloksan 125 mg/kgBB + infusa kulit semangka 1500 mg/kgBB)

C = Pemberian pakan dan minum + induksi aloksan 125 mg/kgBB + infusa kulit semangka 2000 mg/kgBB)

Penelitian ini menggunakan lima perlakuan dengan lima pengulangan pada masing-masing perlakuan. Berikut ragam unit eksperimen :

$K+ = K_{+1}, K_{+2}, K_{+3}, K_{+4}, K_{+5}$

$K- = K_{-1}, K_{-2}, K_{-3}, K_{-4}, K_{-5}$

$A = A_1, A_2, A_3, A_4, A_5$

$B = B_1, B_2, B_3, B_4, B_5$

$C = C_1, C_2, C_3, C_4, C_5$

3.6.1. Desain Rancangan Percobaan Acak Lengkap (RAL)

Setiap petak memiliki sifat homogen sehingga penempatan setiap unit eksperimen pada petak dilakukan dengan cara acak.

Tabel 3.1. Denah Desain RAL

C_5	C_1	K_{-3}	A_1	B_2
K_{+2}	A_2	C_2	B_1	K_{-1}
A_3	B_5	K_{+1}	K_{-5}	A_4
B_3	K_{+5}	A_5	C_4	K_{+3}
K_{-4}	K_{-2}	B_4	K_{+4}	C_3

Keterangan :

A : Perlakuan I

B : Perlakuan II

C : Perlakuan III

$K-$: Kontrol positif (-)

$K+$: Kontrol positif (+)

1 : Pengulangan ke-1

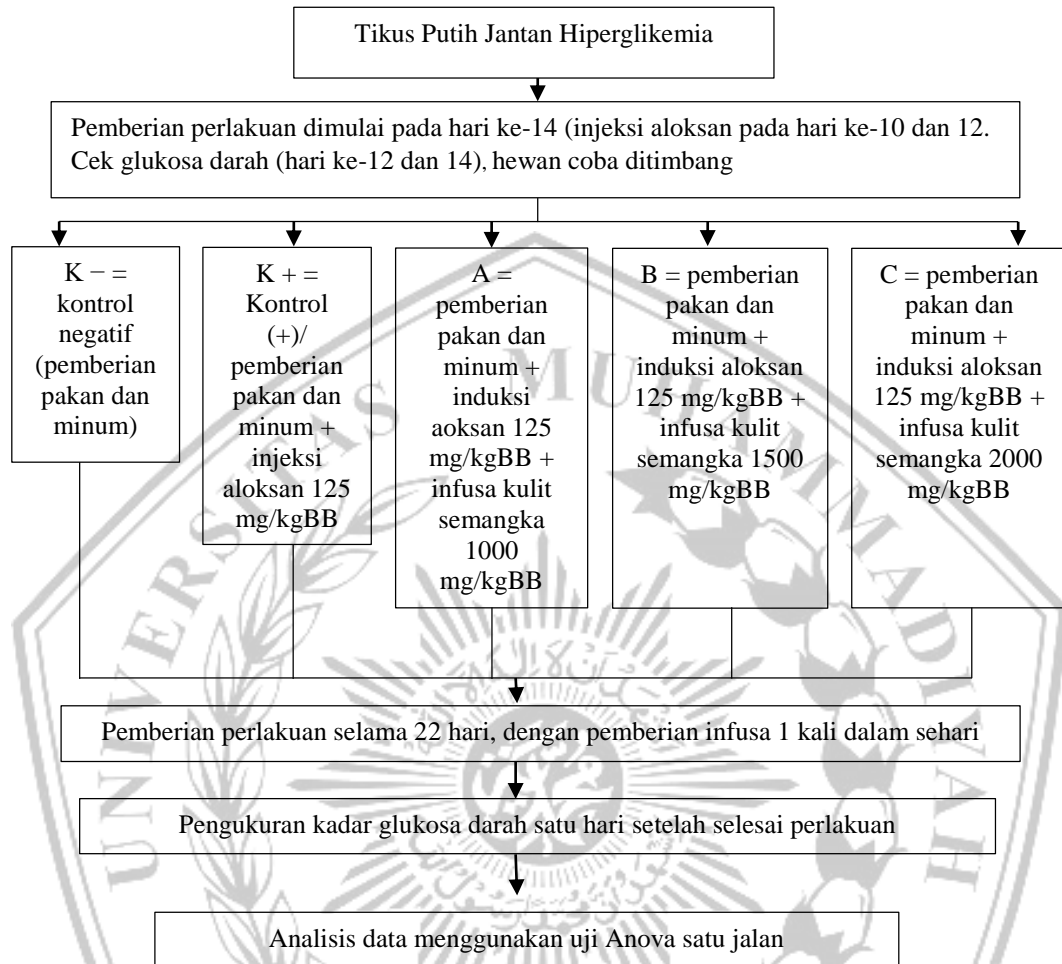
2 : Pengulangan ke-2

3 : Pengulangan ke-3

4 : Pengulangan ke-4

3.7. Alur dan Prosedur Penelitian

3.7.1. Alur Penelitian



Gambar 3.2. Alur Penelitian

3.7.2. Prosedur Penelitian

3.7.2.1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan penelitian adalah tahapan mempersiapkan segala sesuatu yang dibutuhkan dalam penelitian, hal-hal yang perlu disiapkan dalam penelitian ini adalah :

a. Persiapan alat dan bahan

Alat :

Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain, kandang hewan coba (15 buah), jaring penutup kandang (15 buah), gelas ukur (1 buah), spuit injeksi 3 ml (10 buah), gelas beker (2 buah), timbangan analitik (1 buah), timbangan kue (1 buah), handscun (2 pasang), jarum sonde (4 buah), botol obat (3 buah), botol air minum tikus (30 buah), tempat makan tikus (15 buah), kompor listrik (1 buah), thermometer (1 buah), pengaduk (1 buah), penjepit tabung (2 buah), blender (1 buah), scalpel (2 buah), pinset (2 buah), gunting bedah (2 buah), jarum pentul (8 buah), papan paraffin (2 buah), syringe 3 ml (25 buah), vaculab (25 buah), tabung serum (25 buah), spektrofotometer UV-Vis (1 buah), rak tabung (1 buah), mikropipet (1 buah), sentrifuge eba 20 (1 buah), *yellow tip micropippete* (25 buah), inkubator (1 buah), timer (1 buah), kamera (1 buah), glukostrip (2 botol), glucometer (1 buah), toples (1 buah), labu takar 100 ml (1 buah), dan sarung tangan kain (2 pasang).

Bahan :

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian antara lain, albedo kulit semangka, hewan coba (30 ekor), aquades, aloksan (6 gram), alkohol 70%, pakan BR1, serutan kayu, tissue, kapas, kloroform (50 ml), kertas label, serum darah hewan coba, reagen glukosa oksidase, dan aqua 1600 ml (2 dus).

b. Persiapan hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus jantan galur wistar sebanyak 25 ekor dengan usia 4-5 bulan, berat badan 150-200 gram. Melakukan penimbangan berat badan tikus, penandaan/pelabelan hewan uji, serta meletakkan dan mengelompokkan hewan uji pada kandang-kandang yang telah disiapkan. mengambil tikus secara acak lalu disimpan pada kandang-kandang yang

sudah disediakan. Pengelompokan tikus secara acak lalu disimpan pada kandang-kandang yang sudah disediakan.

Tikus yang sudah terpilih kemudian dikelompokkan berdasarkan perlakuan masing-masing, serta diberi label pengelompokan pada ekor tikus. Setelah itu memberi label pada masing-masing kandang sesuai perlakuan yaitu: kelompok A, kelompok B, kelompok C, dan kelompok kontrol negatif (-) kelompok kontrol positif (+). Hewan coba sebanyak 25 ekor dibagi menjadi lima kelompok, dengan masing-masing kelompok terdapat lima hewan coba..

c. Aklimatisasi hewan uji

Hewan uji diaklimatisasi selama 10 hari di dalam laboratorium, agar dapat beradaptasi dengan lingkungan dan perlakuan baru. Selama aklimatisasi, semua kelompok diletakkan pada kandang yang diberi medium berupa serutan kayu (satu kandang berisi 1-2 ekor tikus), pemberian minum secara *ad libitum*, pakan jenis BR-1 sebanyak 10gr/200grBB, dipelihara pada suhu ruangan, dan dengan ventilasi udara yang cukup memadai.

3.7.2.2.Tahap Pelaksanaan

Pada penelitian ini, tahapan pelaksanaan yang dilakukan antara lain :

a. Peningkatan kadar glukosa darah tikus

Semua hewan uji diinjeksi secara intraperitoneal dengan aloksan sebanyak 125 mg/kgBB sebelum perlakuan. Aloksan terbukti menyebabkan diabetes pada tikus jantan strain wistar dengan berat 200–250 gram yang diberikan aloksan dengan dosis 125 mg/kgBB (Al-awar et al., 2016).

1) Pembuatan larutan stok aloksan:

Dosis aloksan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 125 mg/kgBB. Kebutuhan aloksan setiap tikus jika memiliki berat badan 200 gram adalah 25 mg.

Larutan aloksan 1% dibuat sebagai penginduksi diabetes dibuat dengan cara melarutkan 1 gram aloksan monohidrat ke dalam 100 ml larutan NaCl 0,9 %. Dosis aloksan monohidrat 125 mg/kgBB secara intraperitoneal untuk tikus dengan berat badan 200 gram adalah 25 mg/200grBB. Maka, volume pemberian untuk tikus dengan berat badan 200 gram adalah :

$$\begin{aligned}\text{Aloksan } 1 \% &= 1 \text{ gr}/100 \text{ ml} \\ &= 1000 \text{ mg}/100 \text{ ml} \\ &= 10 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

Volume pemberian aloksan untuk 200 gram berat badan tikus adalah: $\frac{25 \text{ mg}}{10 \text{ mg}} \times 1 \text{ ml} = 2,5 \text{ ml}$

Hari ke-10 pasca aklimatisasi, aloksan diinduksi ke hewan coba, 48 jam setelah tikus diinjeksi aloksan, langkah selanjutnya adalah dilakukan pengambilan darah dari ekor tikus tetapi tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 16 jam. Pada hari ke-12 kadar glukosa darah puasa hewan coba belum naik cukup banyak dan belum stabil, maka semua hewan coba diinduksi aloksan lagi. Pada hari ke -14 perlakuan, kadar glukosa darah hewan coba sudah menunjukkan kenaikan yang melebihi nilai batas kadar gula normal pada tikus kondisi hiperglikemia yang menetap dan juga stabil, maka pemberian infusa albedo semangka dapat dilakukan sejak hari ke -14.

b. Pembuatan infusa albedo kulit semangka

Kulit buah semangka diambil bagian mesokarpnya yang berwarna putih (albedo), kemudian albedo kulit semangka diblender tanpa menggunakan air. Setelah itu diseduh dengan air panas 200 ml selama 15 menit pada suhu 90°C. Kemudian dilakukan penyaringan infusa. Penggunaan albedo semangka sesuai dengan dosis yang telah ditentukan.

1) Perencanaan dosis infusa albedo kulit semangka :

Penelitian mengenai evaluasi toksisitas kulit semangka untuk konsumsi manusia dengan menggunakan berbagai dosis (500 mg/kgBB, 1500 mg/kgBB, dan 3500 mg/kgBB) mendapatkan hasil bahwa kulit semangka dengan dosis berapapun tidak memiliki efek buruk pada ginjal dan hati, sehingga aman untuk dikonsumsi (Arojojoye, Ladokun, Aminu, & Durosinslorun, 2018).

Dosis yang digunakan pada penelitian ini yaitu 1000 mg/kgBB, 1500 mg/kgBB, dan 2000 mg/kgBB. Dosis yang digunakan dalam penelitian tersebut ditujukan untuk tikus dengan berat badan 1000 gr (1 kg), sedangkan

dalam penelitian ini dosis yang digunakan bergantung pada berat badan tikus yang telah ditimbang, sehingga dosis dapat dikonversikan dengan cara:

$$\frac{BB \text{ Tikus}}{1000 \text{ gram}} \times \text{dosis yang digunakan}$$

2) Penyondean dosis infusa albedo kulit semangka ke hewan coba :

Penyondean dosis infusa albedo kulit semangka pada tikus dihasilkan dari konversi konsumsi satu gelas air pada masyarakat sebanyak 200 ml. Takaran konversi dosis untuk manusia dengan berat badan (BB) 70 kg, dan jika pada tikus dengan berat badan 200 g adalah 0,018 (Isnania, Fatimawali, & Wehantouw, 2014). Berat badan rata-rata masyarakat adalah 50 kg, maka dosis untuk tikus 200 gram, yaitu:

$$\frac{50}{70} \times 200 \text{ ml} \times 0,018 = 2,57 \text{ ml}/200\text{grBB} \text{ (dibulatkan menjadi } 3 \text{ ml}/200\text{grBB})$$

c. Uji penurunan kadar glukosa darah tikus

Semua hewan uji diberi perlakuan pada hari ke-14 hingga hari ke-36, kecuali kelompok kontrol positif dan negatif dengan menggunakan infusa albedo kulit semangka sesuai dosis yang telah direncanakan sebelumnya. Pemberian dosis dilakukan selama 22 hari menggunakan metode sonde lambung dengan intensitas pemberian sekali dalam sehari pada pukul 09.00 WIB.

d. Prosedur pembiusan, pembedahan, dan pengambilan darah

Pengambilan darah diawali dengan membius (anestesi) hewan coba, dengan cara memasukkan hewan coba ke dalam toples berisi kapas yang telah dicampur dengan kloroform selama ± 20 detik (hingga hewan coba benar-benar pingsan). Anestesi dilakukan secara inhalasi pada hewan coba dengan dosis 10 ml/10 hewan coba. Hewan coba yang telah pingsan, diletakkan di atas meja lilin untuk dilakukan prosedur pembedahan (memberi alkohol pada bagian yang akan dibedah). Pembedahan dilakukan dengan arah vertikal dari bagian bawah hingga pangkal leher. Setelah sampai pangkal leher arah pembedahan diubah ke arah horizontal agar organ dalam hewan coba terlihat. Darah diambil dari bagian jantung

sebanyak 2-3 ml dengan menggunakan *syringe* ukuran 3 ml, kemudian darah dipindahkan ke dalam *vaculab* untuk segera di *sentrifuge* dan diambil serumnya.

e. Prosedur penguburan

Hewan coba yang sudah dibedah dipastikan tidak mengalami *recovery*. Bangkai hewan coba dikubur di tanah dengan kedalaman minimal 50 cm dan luas lubang 0,25 m². Setiap lubang digunakan untuk mengubur 10 hewan coba sekaligus. Lubang ditutup kembali dengan tanah lalu diratakan dan dipadatkan agar tidak tercium bau bangkai hewan coba tersebut.

3.7.2.3. Tahap Pengamatan

a) Uji kadar glukosa darah

Uji kadar glukosa darah dilakukan pada saat sebelum perlakuan dosis untuk mengetahui apakah hewan coba telah mengalami kondisi hiperglikemik atau belum. Kadar glukosa darah tikus yang telah mengalami kondisi hiperglikemik adalah >198 mg/gl (Suarsana, Utama, Agung, & Suartini, 2011).

Kadar glukosa darah tikus diukur pada hari terakhir setelah semua perlakuan selesai yaitu pada hari ke-36 yang dilakukan di Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang. Uji kadar glukosa darah menggunakan metode spektrofotometri. Prosedur pengukuran kadar glukosa darah dengan metode spektrofotometri sebagai berikut :

1. Sampel darah yang telah diambil dan dimasukkan ke dalam *vaculab* yang sudah diberi label masing-masing, di *sentrifuge* dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit
2. Mengambil supernatant (serum) sebanyak 20 µl dengan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung serum yang telah berlabel (blanko, sampel, standar)
3. Masing-masing sampel dalam kuvet dicampur dengan reagen glukosa oksidase (GOD) sebanyak 200 µl
4. Sampel yang telah tercampur, diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C

5. Membaca absorbansinya sampel dan standar terhadap blanko pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm.
6. Menghitung kadar glukosa darah dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar glukosa darah (mg/dl)} = \frac{As}{Ast} \times 100$$

Keterangan :

As : absorbansi sampel

Ast : absorbansi standar

3.8. Teknik Pengumpulan Data

Metode yang digunakan dalam pengumpulan data yaitu metode observasi tidak langsung, dengan tujuan untuk mendapatkan data pengaruh pemberian perlakuan terhadap kadar glukosa darah tikus.

Tabel 3.2. Hasil pengukuran kadar glukosa darah pada hewan coba

Perlakuan	Kadar Glukosa Darah (mg/dl)					Rerata (mg/dl)	SD
	1	2	3	4	5		
K-							
K+							
A							
B							
C							

3.9. Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah Uji *One Way Anova* bertujuan untuk mengetahui perbedaan rata-rata penurunan kadar glukosa darah tikus secara signifikan antara lebih dari dua kelompok sampel. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16.0.

Penggunaan analisis data *One Way Anova* harus dipenuhi terlebih dahulu persyaratannya yaitu data harus terdistribusi normal dan varian dari 5 kelompok uji adalah sama. Pengujian normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk. Uji ini digunakan untuk melihat kenormalan dari data yang diperoleh dan digunakan pada kelompok populasi kecil yaitu kurang dari 50 sampel data. Pada uji ini, data dikatakan terdistribusi normal apabila nilai probabilitasnya >0,05 dan tidak terdistribusi normal apabila nilai probabilitasnya <0,05.

Pengujian varian digunakan uji *Homogeneity Of Variances* dengan *Levene test*. Jika data kemudian data berdistribusi normal dan memiliki varian yang sama maka dilanjutkan uji *One Way Anova* dan *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok yang berbeda secara bermakna. Jika data tidak berdistribusi normal, maka menggunakan analisis data *Kruskal Wallis*. *Kruskal Wallis* adalah uji non parametrik yang merupakan alternative bagi uji *One Way Anova* apabila tidak memenuhi asumsi, misalnya asumsi normalitas data.

Langkah-langkah pengujian hipotesis dengan *One Way Anova* (secara manual):

1. Syarat *One Way Anova* yaitu data berdistribusi normal (pengujian normalitas data) dan varians (s^2) sama
2. *One Way Anova*

- a. Menghitung Jumlah Kuadrat Total (JK_{tot}) dengan rumus :

$$JK_{tot} = \sum X_{tot}^2 - \frac{(\sum X_{tot})^2}{N}$$

- b. Menghitung Jumlah Kuadrat Antar Kelompok (JK_{ant}) dengan rumus :

$$JK_{ant} = \sum \frac{(\sum X_{kel})^2}{n_{kel}} - \frac{(\sum X_{tot})^2}{N}$$

- c. Menghitung Jumlah Kuadrat dalam Kelompok (JK_{dal}) dengan rumus :

$$JK_{dal} = JK_{tot} - JK_{ant}$$

- d. Menghitung Mean Kuadrat Antar Kelompok (MK_{ant}) dengan rumus :

$$MK_{ant} = \frac{JK_{ant}}{m-1}$$

- e. Menghitung Mean Kuadrat Dalam Kelompok (MK_{dal}) dengan rumus :

$$MK_{dal} = \frac{JK_{dal}}{N-m}$$

- f. Menghitung F hitung dengan rumus :

$$F_{hit} = \frac{MK_{ant}}{MK_{dal}}$$

- g. Membandingkan harga F hitung dengan F tabel (tabel F) dengan F tabel (Tabel F) dengan dk pembilang ($m-1$) dan dk penyebut ($N-1$). Bila harga $F_h \leq F_t$ maka H_0 diterima dan bila $F_h > F_t$ maka H_0 ditolak.

Keterangan :

N = Jumlah seluruh anggota sampel, m = Jumlah kelompok sampel

